

Különböző talajtényezők hatása a *Rhizobium leguminosarum* törzsek szaporodására és túlélésére

¹ H. E. A. F. BAYOUMI HAMUDA, ² KECSKÉS MIHÁLY, ² KISS ZITA,
² VÁRADY GYÖRGY, ³ BALÁZSY SÁNDOR és ² KUCSMA NÓRA

¹ MTA Környezetvédelmi Mikrobiológiai Tanszéki Kutatócsoport, Gödöllő,
² Gödöllői Agrártudományi Egyetem, Mikrobiológiai Tanszék és ³ Bessenyei György
Tanárképző Főiskola, Nyíregyháza

A rhizobium oltóanyaggal szembeni fő követelmények közé tartozik az, hogy az azt alkotó törzs vagy törzsek talajban és a növények rizoszférájában gyorsan szaporodjanak, és akkor is megtalálhatóak legyenek a talajban, amikor a gazdaszervezetük nincs jelen. Ma még viszonylag hiányosak az információink a környezeti tényezők rhizobiumokra kifejtett hatásáról. Közismert, hogy a talaj pH-ja igen jelentős hatással van a rhizobiumok túlélésére. A savanyú talajok befolyása a rhizobiumokra jelentősebb a makroszimbionta szimbiózis-hatásnál (VINCENT, 1965). Azonos fajhoz tartozó különböző *Rhizobium* törzsek is különféleképpen reagálnak a talaj pH-jára.

A rhizobiumok - mint ismert - mezofil baktériumok, nitrogénkötő funkciójukat mind a trópusi, szubtrópusi, a mérsékelt és a szubarktikus éghajlaton is el látják. Különböző törzseik eltérően viselkednek 40 °C-on (VINCENT, 1965). ROUGHLEY & DART (1970) megfigyelte, hogy az inváziót késleltette a gyökér hőmérsékletének csökkenése a 11-19 °C-os tartományban. Jelentős hőtűrőképességgel rendelkeznek azok a törzsek, melyek a szubtrópusi félsivatagi és az öntözött sivatagi területek pillangós növény kultúráinak gyökérgümőiben fordulnak elő. A hőmérsékleten kívül más talajtényezők is befolyásolják a rhizobiumok szaporodását. A nagy hőmérsékletnek károsító hatása van a magvak felszínén vagy a talajban levő rhizobium inokulumra. CLOUTIER és munkatársai (1992) vizsgálták a hőmérséklet-változás hatását a pszichrofil és mezofil *Rhizobium* törzsekre. Megállapították, hogy az arktikus és mérsékeltövi törzsek szaporodása csökkent a hőmérséklet sokkszerű emelésével.

A hőmérsékleten kívül a nedvesség szintén meghatározó tényező a rhizobiumok talajbeli szaporodásában. A rhizobium sejteket egy vékony vízréteg veszi körül, melyben az oldott anyagok koncentrációja nem olyan nagy, hogy az károsítsa a sejteket. Ezért a túl kevés víz jobban gátolja a rhizobiumok életműködéseit, mint a nagy víztartalom. A legtöbb pillangós növényben szárazság hatására először a nitrogénkötő aktivitás csökken, majd a növény növekedése. A

vízhiány a gümők súlyát jobban befolyásolja, mint a számát (PANKHURST & SPRENT, 1975; PATTERSON et al., 1979; SINCLAIR et al., 1987, 1988). KIRDE és munkatársai (1989) megemlítették, hogy a N_2 -kötés a szárazságra a legérzékenyebb, a vízhiány jobban befolyásolta a gümősúlyt a gümőszámnál. A rendkívüli szárazság a talajoldat ozmotikus nyomásának növekedésével jár akkor is, ha a szárazságot a nagy hőmérséklet okozza. A talaj nedvességtartalma hasonlóan fontos szerepet játszik a rhizobiumok túlélésében és inváziójában. NECASEK és munkatársai (1993) vizsgálták a szobahőmérsékletű száraz és steril talaj hatását a *R. leguminosarum* és *R. meliloti* törzsek szuszpenziójának sejtszámára. Kimutatták, hogy a *R. meliloti* törzs sejtszáma kisebb volt a 16 hónapos tárolás után. Ugyanakkor a *R. leguminosarum* 10x-100x nagyobb sejtszámot produkált a 7 hónapos tárolási idő alatt, mint az eredeti inokulum.

A szakirodalomban nem találunk kielégítő tájékoztatást arról, hogy a talajok különböző autoklávozása milyen hatással van a rhizobiumok szaporodására a talaj tápanyagtartalma szempontjából. POSTMA és munkatársai (1990) megállapították, hogy a rhizobiumok reguláris szaporodása megegyezett a sterilizált és a nem sterilizált talajokban.

Vizsgálatunk célja az volt, hogy meghatározzuk azokat az optimális talaj-tényezőket, melyek alkalmasak a lóbab (*Vicia faba*) oltására használt különböző *R. leguminosarum* törzsek maximális szaporodásának kiváltására.

Anyag és módszer

Rhizobium törzsek. - Négy különböző *R. leguminosarum* törzset (a líbiai talajból származó 240 µg/ml sztreptomycin rezisztens HB-3841, a magyar eredetű Lóbab-Z és Bükköny 75/4, valamint az angliai E1012) élesztőkivonat-mannit (YEM) agaron tenyésztettünk, mely 3 g/l $CaCO_3$ -ot tartalmazott (KLECZKOWSKA et al., 1968), 28 °C-on 36 óráig inkubáltuk, majd a friss, logaritmikus fázisban lévő kultúrákat 0,85 %-os NaCl-oldatban szuszpendáltuk.

Talajminták. - A 4,6 pH-jú gödöllői barna erdőtalajból 25 cm-es mélységig vettünk mintát, miután annak felső 2 cm-es rétegét eltávolítottuk. A talajt szobahőmérsékleten súlyállandóságig szárítottuk, miközben többször összekevertük és 2 mm lyukátmérőjű szitán átrostáltuk. Az oltásra 50 g talajmintát készítettünk elő, amit a pH beállítása után 150 ml-es steril üvegcsövekbe raktunk. A talaj és desztillált víz 1:1 arányú szuszpenziójából határoztuk meg a pH-t, és 1 N KOH-oldattal állítottuk be 4,6-ról 5,1, 6,4, 7,0 és 8,4 értékekre. A második sorozatban a nedvességtartalmat oly módon változtattuk, hogy a talaj légszáraz tömegének 0, 25, 50, 75 és 100 %-át adtuk kétszeresen desztillált víz formájában a mintákhoz. Az üvegcsövek harmadik sorozatát három csoportba osztottuk: nem autoklávozott (a), rövidebb ideig autoklávozott (b) és hosszabb ideig autoklávozott (c).

a) nem autoklávozott.

b) rövidebb ideig autoklávozott: három napig - az első és harmadik napon 2 alkalommal, az autoklávozások között 4 órás szünetet tartva (a második napon kezelés nem volt) - minden egyes alkalommal 7,5 percen át 1 atm nyomáson 121 °C-on;

c) hosszabb ideig autoklávozott: három napig - az első és harmadik napon 4 alkalommal, az autoklávozások között 4 órás szünetet tartva (a második napon kezelés nem történt) - minden alkalommal 15 percen át 1 atm nyomáson 121°C-on;

Talajminták oltása és inkubációja. - A négy *Rhizobium* törzset YEM tápoldatot tartalmazó 250 ml-es lombikokba oltottuk és 36 órán át 28 °C-on rázógépen ráztuk (150 ford./perc). A rhizobium szuszpenzióból (10^6 sejtszám/ml) 2,5 ml-t oltottunk az üvegcsövekbe és összekevertük azokat. A 7,3 pH-jú, 35%-os nedvességtartalmú steril talajt tartalmazó üvegcsöveket 5, 15, 28, 35 és 45 °C-on inkubáltuk. A pH-kísérleteket 33 % nedvességtartalmú steril talajon végeztük, az inkubációs hőmérséklet 28 °C volt. A nedvességtartalom hatását a 7,3 pH-jú steril talajban ellenőriztük, az inkubációs hőmérséklet szintén 28 °C volt. Az autoklávozási kísérletekben a talaj pH-ja 7,3, nedvességtartalma 33 %, inkubációs hőmérséklete 28 °C volt. Harminchat óránként megmértük minden üvegcső tömegét a nedvességtartalom ellenőrzése céljából. Az inkubációs idő négy hét volt.

Telepszámlálás. - A négy *R. leguminosarum* törzs szaporodását agarlemezen történő élő sejtszám meghatározással végeztük a kiindulási inokulumból (10^6 sejtszám/g talajnak \log_{10} kb. 4,7) és a különböző kezelések után a talajban maradtakból. Az üvegcsövek tartalmát egy-egy 450 ml steril oldatot (melynek összetétele: 0,3 g KH_2PO_4 és 0,7 g K_2HPO_4 /l desztillált víz) (ACEA et al., 1988) tartalmazó üvegbe tettük. Az üvegeket 30 percig ráztuk (150 ford./perc) a talajrészecskék szétoszlása végett. Ezután hígítási sort készítettünk az oldatokból. Minden hígításból három ismételtsben szélesztettünk kongóvörös indikátort tartalmazó YEM tápagarra (1 ml talajszuszpenzió/12 ml táptalaj). A telepeket 28 °C-on 48 órán át történő inkubáció után számláltuk meg.

Statisztikai analízis. - A statisztikai számításokat az adatok \log_{10} (x) átalakítása után ANOVA analízissel végeztük. A szignifikancia szintet $P = 0,05$ érték mellett vizsgáltuk.

Vizsgálati eredmények

Az ismétlődő, időben és jellegükben változó környezeti hatásoknak nagy szerepük van a rhizobiumok szaporodására. A különböző talajfeltételek mellett tenyésztett négy *Rhizobium* törzs szaporodásának meghatározását élő sejtszám mérésének módszerével végeztük az alábbiak szerint.

A talajok pH-változásának hatása a törzsek szaporodására

Négyhetes 28 °C-os inkubáció alatt a különböző *Rhizobium* törzsekkel oltott üvegcsövekben (a talaj pH-ja különböző) azt figyelhettük meg, hogy 4,6-os pH-nál minden törzs sejtszáma csökkent az inkubációs idő előrehaladtával, kivéve a Bükköny 75/4-es törzset. Itt a második héten emelkedett a sejtszám, de kevesebb volt, mint az eredeti oltóanyag sejtszáma, és az inkubációs idő növekedésével ez is lecsökkent. Az adott feltételek mellett az egyhetes inkubáció alatt a Lóbab-Z és a HB-3841 tolerálta a 4,6-es pH-t, míg az E1012-es törzs nem. A törzsek túlélése 5,1-es pH-nál jobb volt, a Lóbab-Z és HB-3841-es törzs sejttömege megközelítette az eredeti oltóanyag mennyiségét a 3. inkubációs hét után. A Bükköny 75/4 törzs sejtszáma pH 5,1-nél az első héten emelkedett, s az idő előrehaladtával csökkent. Az E1012-es törzs nem élte túl ezt a kémhatást. Amikor a talaj pH-ja 6,4, 7,0 és 8,4 volt, az E1012-es törzs jól szaporodott, nagy sejtszámot produkált a négy hét alatt. Ez idő alatt a legjobban a 7,0 pH-nál szaporodott a Líbiából (HB-3841) és Angliából származó (E1012), míg a magyar törzsek számára a három hetes inkubációs idő kedvezett a legjobban ugyanilyen pH mellett. Az összes törzs jobban tolerálta a 8,4-es pH-t, mint a 4,6 vagy az 5,1 értékűt (1-2. táblázat).

A talaj nedvességtartalma

Az általunk vizsgált törzsek közül egyik sem kedvelte a légszáraz és az 50% nedvességtartalmú talajt. A 43 %-os nedvességtartalomnál az E1012 törzs populációja egy hét után kisebb volt, a Bükköny 75/4 tolerálta, míg a HB-3841 jobban szaporodott az E1012 törzsnél. Az inkubáció 2. hetében volt a legnagyobb a sejtszám. Ilyen nedvességtartalom mellett a Lóbab-Z törzs a 3. hétig nagyobb szaporodási rátával növekedett, mint a kezdeti oltóanyag, de a 4. hétre a szaporodás lecsökkent. A 33 %-os nedvességtartalomnál minden törzs maximális növekedést mutatott (1-2. táblázat).

Az autoklávozás hatása a talajra

A két magyar törzs a nem autoklávozott talajokban jól szaporodott a 3. hétig és azután szaporodásuk csökkent. A líbiai és angol eredetű törzsek populációja négy héten át növekedett, de az utóbbi szaporodási rátája kisebb volt a líbiainál. A törzsek a rövidebb ideig autoklávozott talajban szaporodtak a legintenzívebben, míg a hosszabb ideig autoklávozottban a törzsek szaporodása kevésbé intenzívnek mutatkozott. A szaporodás az inkubációs idő előrehaladtával négy héten keresztül nőtt (1-2. táblázat).

1. táblázat
Néhány tényező hatása a *Rhizobium leguminosarum* HB-3841 és Lóbab-Z törzs szaporodására
gödöllői barna erdőtalajon (adatok a kontroll szálalékában)

Tényezők		HB-3841 törzs				Lóbab-Z törzs			
		Inkubációs idő (hét)				Inkubációs idő (hét)			
		1 hét	2 hét	3 hét	4 hét	1 hét	2 hét	3 hét	4 hét
pH	4,6 5,1 6,4 7,0 8,4	88,30 91,49 131,91 140,43 108,51	63,83 93,62 134,04 144,68 112,77	44,68 94,68 136,17 147,87 117,02	27,66 82,98 125,53 153,19 100,00	90,43 93,62 134,04 142,55 117,02	65,96 97,87 137,23 147,87 123,40	53,19 100,00 138,30 155,32 125,53	29,79 85,11 129,79 146,81 106,38
Víztartalom (%)	0 20 33 43 50	42,55 102,13 129,79 82,98 36,17	19,15 112,77 157,45 86,17 17,02	0,00 125,53 160,64 75,74 8,51	0,00 131,91 177,66 61,70 5,32	27,66 106,38 131,91 117,02 31,91	15,96 119,15 153,19 112,77 27,66	0,00 131,91 168,09 108,51 10,64	0,00 117,02 176,60 89,36 4,26
Autoklávozás	a: nincs b: rövid c: hosszú	104,26 121,28 112,77	110,64 136,17 123,40	125,53 151,06 131,91	134,04 163,83 142,55	102,13 129,79 119,15	112,77 146,81 125,53	123,40 155,32 138,30	100,00 170,21 153,19
Hőmérséklet (°C)	5 15 28 35 45	46,81 63,83 125,53 65,96 29,79	40,43 69,15 130,85 70,21 21,28	22,34 71,70 150,00 73,40 0,00	0,00 75,53 165,98 82,98 0,00	65,96 106,38 134,04 104,26 44,68	42,55 119,15 142,55 112,77 38,30	36,17 98,87 146,81 98,87 20,21	19,15 82,98 165,96 85,11 10,64

Megjegyzés: A vastagon jelölt értékeknel szignifikáns eltérés ($P = 5\%$) tapasztalható a kontrollhoz képest.

2. táblázat
Néhány tényező hatása a *Rhizobium leguminosarum* Bükköny 75/4 és E1012 törzs szaporodására
gödöllői barna erdőtalajon

Tényezők		Bükköny 75/4 törzs				E1012 törzs			
		Inkubációs idő (hét)				Inkubációs idő (hét)			
		1 hét	2 hét	3 hét	4 hét	1 hét	2 hét	3 hét	4 hét
pH	4,6	84,04	89,36	55,32	27,66	27,66	23,40	10,64	0,00
	5,1	106,38	89,36	70,21	36,17	36,17	29,79	21,28	5,32
	6,4	138,30	153,19	155,32	125,53	98,87	104,26	110,64	114,89
	7,0	153,19	157,45	168,09	146,81	104,26	11,70	127,66	134,04
	8,4	134,04	138,30	125,53	102,13	91,49	104,26	125,53	114,89
Víztartalom (%)	0	19,15	8,51	0,00	0,00	40,43	25,53	10,64	0,00
	20	117,02	125,53	142,55	127,66	104,26	114,89	134,04	153,19
	33	136,17	153,19	159,57	172,34	114,89	125,53	131,91	157,45
	43	91,49	89,36	81,91	42,55	51,06	48,94	44,68	36,17
	50	19,15	4,26	0,00	0,00	29,79	25,53	19,15	10,64
Autoklavozás	a: nincs	108,51	114,89	125,53	91,49	65,96	78,72	82,98	87,23
	b: rövid	153,32	174,47	176,60	185,11	114,89	125,53	134,04	148,94
	c: hosszú	136,17	144,68	159,57	157,45	108,51	112,77	121,28	131,91
Hőmérséklet (°C)	5	68,09	72,34	59,57	42,55	87,23	70,21	63,83	37,23
	15	104,26	112,77	125,53	127,66	104,26	112,77	91,49	85,11
	28	117,02	121,28	125,53	142,55	108,51	121,28	125,53	134,04
	35	100,00	104,26	82,98	63,83	68,09	63,83	57,45	27,66
	45	53,19	36,17	14,89	4,26	25,53	15,96	0,00	0,00

Megjegyzés: A vastagon jelölt értékeknél szignifikáns eltérés ($P = 5\%$) tapasztalható a kontrollhoz képest.

A hőmérséklet hatása a törzsek túlélésére

A maximális populációszámot a 4 hetes 28 °C-on történő inkubáció után mértük. A rhizobiumok szaporodása jelentősen visszaesett 45 °C-os inkubációs hőmérsékleten, és az 5 °C-nál kedvezőbb volt számukra a 15 °C, különösen az angliai törzs esetében. Csak a Lóbab-Z (magyar) törzs szaporodott a 35 °C-os hőmérsékleten, és közel akkora biomasszát produkált ez idő alatt, mint a kontroll inokulum (1-2. táblázat).

Az eredmények megvitatása

Irodalmi adatok szerint a *Rhizobium* törzsek túlélő képessége a magon és a talajban eltérő (CHATEL et al., 1968; BURTON, 1975). Az ökológiai - köztük a talajra és a talajban ható tényezők - markánsan befolyásolják a rhizobiumok szaporodását, túlélését. A különböző rhizobiumok hőérzékenysége szintén egymástól eltérő (BOWEN & KENNEDY, 1959; CHOWDHURY et al., 1968). Nagyobb hőtoleranciát figyeltek meg a szárítószelektációban szárított talajban (WILKINS, 1967), mint deszikkátorban szárított talajban (DANSO & ALEXANDER, 1974). A magas hőmérsékletre való alkalmazkodást a talaj nedvességtartalma is befolyásolja. Eredményeink azt mutatták, hogy 33 %-os nedvességtartalomnál a legalacsonyabb és legmagasabb hőmérsékleten a rhizobium inokulumok túlélése csökkent. CHEN & ALEXANDER (1973) megállapította, hogy a rhizobiumok szaporodásához szükség van egy minimális víztartalomra. Mi a legnagyobb telepszámot a 20 és 33 %-os, a legkisebbet pedig a 0 %-hoz közeli és 50 %-os nedvességtartalomnál tapasztaltuk. A nagy agyag- és humusztartalmú talajokban nagyobb a rhizobiumok túlélése az agyag- vagy más talajrészecskék közötti interakció miatt. Megfigyeltük, hogy a rövidebb ideig autoklávozott talajmintában a rhizobium inokulum gyorsabban szaporodott, míg a nem steril talajmintákban csökkent a telepek száma. A rhizobium telepek képződését a talaj pH-ja is jelentősen befolyásolja. A trópusi rhizobiumok kevésbé érzékenyek a talaj savasságára, mint más rhizobiumok, és megtalálhatóak 4,5 pH-n vagy ennél savanyúbb talajokban is (VINCENT, 1974). Azt tapasztaltuk, hogy az óceánikus törzs az alacsony pH-ra volt a legérzékenyebb, a mérsékeltövi törzs a közel semleges pH-t részesítette előnyben. A két magyar törzs jobban tolerálta a tág pH-határokat, mint a másik két vizsgált törzs. A nagy szervesetlen sókoncentrációk - pl. a sós talajokban - nehézfémek és a fokozott talajnedvesség ugyanúgy csökkentik a rhizobiumok túlélését, mint a gazdanövények gümőképzését és a nitrogén fixációját (HOLDING & LOWI, 1971; CHATEL & PARKER, 1972; BAYOUMI HAMUDA, 1992). A gyenge túlélést annak tulajdonítják, hogy a törzsek képtelenek elviselni a magas hőmérsékletet és az alacsony nedvességtartalmat (BOWEN & KENNEDY, 1959; BUSHBY & MARSHALL, 1977; PENACABRIALES & ALEXANDER, 1979; VAN RENSBURG & STRIJDOM, 1980; SALEMA et al., 1982; WEAVER et al., 1985; WEAVER & HOLT, 1990). BAL-

DANI & WEAVER (1992) kimutatták, hogy a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* törzsek gyakran tartalmaznak a szimbiózis plazmidján kívül más plazmidokat is. Ezek lehetővé teszik azt, hogy túléljék a magas hőmérsékletet (38-42 °C) és a szárazságot.

Szignifikáns különbség ($P = 0,05$) volt tapasztalható az inokulumok kezdeti és a végső populációja között (1-2. táblázat). A vizsgált törzsek közül a Bükköny 75/4 bizonyult a legtoleránsabbnak az alkalmazott kísérleti körülmények között, majd ezt követte a Lóbab-Z, a HB-3841 és az E1012 törzs. A rhizobiumok talajbeli szaporodása és a talajtényezők közötti összefüggés részletesebb tisztázása az autoklávozáskor történő kémiai változások pontos meghatározása után lehetséges.

Összefoglalás

A különböző *R. leguminosarum* törzsek szaporodását és túlélését vizsgáltuk gödöllői barna erdőtalajban különböző pH-értékeknél (4,6, 5,1, 6,4, 7,0 és 8,4). A többféle nedvességtartalmú talajban (0, 20, 33, 43 és 50 %), valamint a hosszabb és rövidebb ideig autoklávozott, valamint a nem autoklávozott talajokban különböző (5, 15, 28, 35 és 45 °C) inkubációs hőmérsékleteken szaporítottuk a törzseket. Valamennyi kezelt talajminta 50 g-ját 2,5 ml (10^6 sejt/ml) rhizobium szuszpenzióval oltottuk. A törzsek telepeit kongóvörös indikátort tartalmazó élesztő-mannitol agaron számoltuk. Megállapítottuk, hogy a *Rhizobium* törzsek telepszáma 4,6 pH-értéknél a 0, 20 és 50 %-os nedvességtartalomnál, valamint a nem autoklávozott talajban 5, 15 és 45 °C-on volt a legkisebb. A törzsek szaporodását leginkább a következő ökológiai paraméterek segítették: pH 6,4-8,4; 20 és 33 % nedvességtartalom, valamint a rövidebb ideig tartó autoklávozás. E feltételek különösen az E1012 és a Bükköny 75/4 törzs szaporodásának kedveztek. A törzsek túlélési rátája tesztényezőnként változott a négyhetes inkubációs idő folyamán. A vizsgált törzsek közül a Bükköny 75/4 bizonyult a legtoleránsabbnak az alkalmazott kísérleti körülmények között, majd ezt követte a Lóbab-Z, a HB-3841 és az E1012 törzs.

Irodalom

- ACEA, M. J., MOORE, C. R. & ALEXANDER, M., 1988. Survival and growth of bacteria introduced into soil. *Soil Biol. Biochem.* **20**. 509-515.
- BALDANI, J. IVO & WEAVER, R. W., 1992. Survival of clover rhizobia and their plasmid-cured derivatives in soil under heat and drought stress. *Soil Biol. Biochem.* **24**. 737-742.
- BAYOUMI HAMUDA, H. E. A. F., 1992. Factors influencing the optimalization of *Rhizobium leguminosarum* and *Vicia faba* symbiosis. *Cand. Biol. Sci. Dissertation*. Hungarian Academy of Sciences. Budapest.

- BOWEN, G. D. & KENNEDY, M. M., 1959. Effect of high soil temperatures on *Rhizobium* spp. *Queensl. J. Agric. Sci.* **16**. 177-197.
- BURTON, J. C., 1975. Methods of inoculating seeds and their effects on survival of rhizobia. In: *Symbiotic Nitrogen Fixation in Plants*. (Ed.: NUTMAN, P. S.) Cambridge University Press. New York.
- BUSHBY, H. V. A. & MARSHALL, K. C., 1977. Some factors affecting the survival of root-nodule bacteria on desiccation. *Soil Biol Biochem.* **9**. 143-147.
- CHATEL, D. L. & PARKER, C. A., 1972. Inhibition of rhizobia by toxic soil-water extracts. *Soil Biol. Biochem.* **4**. 289-293.
- CHATEL, D. L., GREENWOOD, R. M. & PARKER, C. A., 1968. Saprophytic competence as an important character in the selection of *Rhizobium* for nodulation. In: *Trans. 9th Intern. Congr. Soil Sci.* (Ed.: HOLMES, J. W.) Vol. 2. 65-73. Angus and Robertson. Sydney.
- CHEN, N. & ALEXANDER, M., 1973. Survival of soil bacteria during prolonged desiccation. *Soil Biol. Biochem.* **5**. 213-221.
- CHOWDHURY, M. S., MARSHALL, K. C. & PARKER, C. A., 1968. Growth rates of *Rhizobium trifolii* and *R. lupini* in sterilized soils. *Aust. J. Agric. Res.* **19**. 919-925.
- CLOUTIER, J. et al., 1992. Heat and cold shock protein synthesis in arctic and temperate strains of rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**. 2846-2853.
- DANSO, S. K. A. & ALEXANDER, M., 1974. Survival of two strains of *Rhizobium* in soil. *Proc. Soil Sci. Soc. Amer.* **38**. 86-89.
- HOLDING, A. J. & LOWI, J. F., 1971. Some effects of acidity and heavy metals on the *Rhizobium* leguminous plant association. *Plant & Soil. Spec.* Vol. 153-166.
- KLECZKOWSKA, J. et al., 1968. The identification and classification of *Rhizobium*. In: *Identification Methods for Microbiologists. Part B.* (Eds.: GIBBS, B. W. M. & SHAPTON, D. A.) 51-65. Acad. Press. New York and London.
- KIRDE, C., DANSO, S. K. A. & ZAPATA, F., 1989. Temporal water stress effects on nodulation, nitrogen accumulation and growth of soybean. *Plant & Soil.* **120**. 49-55.
- NECASEK, J. et al., 1993. Drought tolerance of *Rhizobium leguminosarum* and *R. meliloti*. *Folia Microbiol.* **38**. 320-324.
- PANKHURST, C. E. & SPRENT, J. I. 1975. Effects of water stress on the respiratory and nitrogen fixing activity of soybean root nodules. *J. Exp. Bot.* **26**. 287-304.
- PATTERSON, R. P., RAPER, J. C. D. & GROSS, D. H., 1979. Growth and specific nodule activity of soybean during application and recovery of leaf moisture stress. *Plant Physiol.* **64**. 551-556.
- PENA-CABRIALES, J. J. & ALEXANDER, M., 1979. Survival of *Rhizobium* in soils undergoing drying. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **43**. 962-966.
- POSTMA, J., HOK-A-HIN, C. H. & OUDE VOSHAAR, J. H., 1990. Influence of inoculum density on the growth and survival of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* introduced into sterile and non-sterile loamy sand and silt loam. *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**. 49-58.
- VAN RENSBURG, H. J. & STRIJDOM, B. W., 1980. Survival of fast- and slow-growing *Rhizobium* spp. under conditions of relatively mild desiccation. *Soil Biol. Biochem.* **12**. 353-356.

- ROUGHLEY, R. J. & DART, P. J., 1970. Root temperature and root-hair infection of *Trifolium subterraneum* L. cv. Cranmore. *Plant & Soil*. **32**. 578-520.
- SALEMA, M. P. et al., 1982. Rupture of nodule bacteria on drying and rehydration. *Soil Biol. Biochem.* **14**. 15-22.
- SINCLAIR, T. R., ZIMET, A. R. & MUCHOW, R. C., 1988. Changes in soybean nodule number and dry weight in response to drought. *Field Crop Res.* **18**. 197-202.
- SINCLAIR, T. R. et al., 1987. Relative sensitivity of nitrogen and biomass accumulation to drought in the field-grown soybean. *Agron. J.* **79**. 986-991.
- VINCENT, J. M., 1965. Environmental factors in the fixation of nitrogen by the legume. In: *Soil Nitrogen*. (Eds.: BARTHOLOMEW, W. V. & CLARK, F. E.) 384-435. Am. Soc. Agron. Inc. Madison, Wisc.
- VINCENT, J. M., 1974. Root-nodule symbiosis with *Rhizobium*. In: *The Biology of Nitrogen Fixation*. (Ed.: QUISPÉL, A.) 265-341. North Holland Publishing Company. Amsterdam.
- WEAVER, R. W. & HOLT, E. C., 1990. Short-term survival of rhizobia on arrowleaf clover seed at different depth. *Plant & Soil*. **122**. 147-150.
- WEAVER, R. W. et al., 1985. Survival of *Rhizobium trifolii* in soil following inoculation of arrowleaf clover. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1**. 331-338.
- WILKINS, J., 1967. The effects of high temperature on certain root nodule bacteria. *Aust. J. Agric. Res.* **18**. 299-304.